

特 許 協 力 条 約

P C T

特許性に関する国際予備報告（特許協力条約第二章）

（法第 12 条、法施行規則第 56 条）

〔P C T 36 条及び P C T 規則 70〕

出願人又は代理人 の書類記号 05-103NIT	今後の手続きについては、様式 P C T / I P E A / 4 1 6 を参照すること。	
国際出願番号 P C T / J P 2 0 0 5 / 0 0 5 6 7 7	国際出願日 (日. 月. 年) 2 8 . 0 3 . 2 0 0 5	優先日 (日. 月. 年) 3 1 . 0 3 . 2 0 0 4
国際特許分類 (I P C) Int.Cl. C07K5/08(2006.01)i, A61K8/00(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61P17/00(2006.01)i, A61Q5/00(2006.01)i, C07K5/10(2006.01)i, C07K7/06(2006.01)i		
出願人 (氏名又は名称) 独立行政法人産業技術総合研究所		

1. この報告書は、P C T 35 条に基づきこの国際予備審査機関で作成された国際予備審査報告である。 法施行規則第 57 条 (P C T 36 条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。
3. この報告には次の附属物件も添付されている。 a. <input checked="" type="checkbox"/> 附属書類は全部で 1 7 ページである。 <input checked="" type="checkbox"/> 補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関が認めた訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面の用紙 (P C T 規則 70. 16 及び実施細則第 607 号参照) <input type="checkbox"/> 第 I 欄 4. 及び補充欄に示したように、出願時における国際出願の開示の範囲を超えた補正を含むものとこの国際予備審査機関が認定した差替え用紙 b. <input type="checkbox"/> 電子媒体は全部で (電子媒体の種類、数を示す)。 配列表に関する補充欄に示すように、電子形式による配列表又は配列表に関連するテーブルを含む。 (実施細則第 802 号参照)
4. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。 <input checked="" type="checkbox"/> 第 I 欄 国際予備審査報告の基礎 <input type="checkbox"/> 第 II 欄 優先権 <input type="checkbox"/> 第 III 欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 <input type="checkbox"/> 第 IV 欄 発明の単一性の欠如 <input checked="" type="checkbox"/> 第 V 欄 P C T 35 条 (2) に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 <input type="checkbox"/> 第 VI 欄 ある種の引用文献 <input type="checkbox"/> 第 VII 欄 国際出願の不備 <input type="checkbox"/> 第 VIII 欄 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 2 7 . 0 1 . 2 0 0 6	国際予備審査報告を作成した日 2 5 . 0 7 . 2 0 0 6		
名称及びあて先 日本国特許庁 (I P E A / J P) 郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5 東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号	特許庁審査官 (権限のある職員) 植原 克典	4 B	9 8 4 0
	電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8		

様式 P C T / I P E A / 4 0 9 (表紙) (2 0 0 5 年 4 月)

第 I 欄 報告の基礎

1. 言語に関し、この予備審査報告は以下のものを基礎とした。

- ☒ 出願時の言語による国際出願
- ☐ 出願時の言語から次の目的のための言語である _____ 語に翻訳された、この国際出願の翻訳文
- ☐ 国際調査 (PCT規則12.3(a)及び23.1(b))
- ☐ 国際公開 (PCT規則12.4(a))
- ☐ 国際予備審査 (PCT規則55.2(a)又は55.3(a))

2. この報告は下記の出願書類を基礎とした。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差替え用紙は、この報告において「出願時」とし、この報告に添付していない。)

☐ 出願時の国際出願書類

☒ 明細書

第 1, 2, 4-6 _____ ページ、出願時に提出されたもの

第 3, 3/1, 7-18 _____ ページ*, 27.01.2006 付けで国際予備審査機関が受理したもの

第 _____ ページ*, _____ 付けで国際予備審査機関が受理したもの

☒ 請求の範囲

第 _____ 項、出願時に提出されたもの

第 _____ 項*, PCT19条の規定に基づき補正されたもの

第 13-30 _____ 項*, 27.01.2006 付けで国際予備審査機関が受理したもの

第 _____ 項*, _____ 付けで国際予備審査機関が受理したもの

☒ 図面

第 1-15 _____ ページ/図、出願時に提出されたもの

第 _____ ページ/図*, _____ 付けで国際予備審査機関が受理したもの

第 _____ ページ/図*, _____ 付けで国際予備審査機関が受理したもの

☒ 配列表又は関連するテーブル

配列表に関する補充欄を参照すること。

3. ☒ 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 _____ ページ

☒ 請求の範囲 第 1-12 _____ 項

☐ 図面 第 _____ ページ/図

☐ 配列表 (具体的に記載すること) _____

☐ 配列表に関連するテーブル (具体的に記載すること) _____

4. ☐ この報告は、補充欄に示したように、この報告に添付されかつ以下に示した補正が出願時における開示の範囲を超えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c))

☐ 明細書 第 _____ ページ

☐ 請求の範囲 第 _____ 項

☐ 図面 第 _____ ページ/図

☐ 配列表 (具体的に記載すること) _____

☐ 配列表に関連するテーブル (具体的に記載すること) _____

* 4. に該当する場合、その用紙に“superseded”と記入されることがある。

第Ⅴ欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第 12 条（PCT35 条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1 3 - 3 0	有
	請求の範囲		無
進歩性 (I S)	請求の範囲	1 3 - 2 5, 2 9 - 3 0	有
	請求の範囲	2 6 - 2 8	無
産業上の利用可能性 (I A)	請求の範囲	1 3 - 3 0	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明 (PCT 規則 70.7)

文献 2 : US 2003/0176354 A1

文献 8 : WO 2001/068145 A2

文献 1 0 : WO 2000/064486 A2

文献 1 1 : US 6093797 A

請求の範囲 2 6 ~ 2 8 について

請求の範囲 2 6 ~ 2 8 に係る発明は、国際調査報告で引用された文献 2、8、1 0、1 1 から新規性は有するが、進歩性は有さない。文献 2 の SEQ ID NO:37 には TryPro IleGlyXaa が、文献 8 の配列番号 8 5 には XaaProIleGlyXaaLeu が、文献 1 0 の 1 7 頁には GlyProIleGlyProZ が、文献 1 1 の SEQ ID NO:3 には ProIleGlyXaa、NO:34 には PheProIleGlyXaa が記載されており、Xaa、Z は任意のアミノ酸であることより、上記文献から請求の範囲 2 6 ~ 2 8 のオリゴペプチド及びその水溶性塩を作製することは当業者が容易に想到することである。

請求の範囲 1 3 ~ 2 5、2 9 ~ 3 0 について

請求の範囲 1 3 ~ 2 5、2 9 ~ 3 0 に係る発明は新規性及び進歩性を有する。

配列表に関する補充欄

第 I 欄 2. の続き

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際予備報告を作成した。

- a. タイプ ☒ 配列表
☐ 配列表に関連するテーブル
- b. フォーマット ☐ 紙形式
☒ 電子形式
- c. 提出時期 ☒ 出願時の国際出願に含まれていたもの
☐ この国際出願と共に電子形式により提出されたもの
☐ 出願後に、調査又は審査のために、この国際機関に提出されたもの
☐ _____ 付けで、この国際予備審査機関が補正*として受理したもの

2. ☐ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：

*第 I 欄 4. に該当する場合、国際予備審査報告書の基礎となる配列表又は配列表に関連するテーブルに“superseded”と記入されることがある。

まで知られていない。

発明の開示

- [0009] 本発明は、比較的簡単に製造することができ、育毛作用のみではなく、皮膚再生のような上皮系細胞増殖促進作用を有する上に、角質層を容易に通過して所望のターゲット細胞に達して効果を発揮し得る新規な水溶性オリゴペプチドを提供することを目的としてなされたものである。
- [0010] 本発明者らは育毛剤として有用な化学物質を開発するために鋭意研究を重ねた結果、バチルス(Bacillus)属バクテリアの培養上清の抽出物中に、優れた育毛効果を示す活性物質が存在すること、及び、育毛作用がこの活性物質中の特定のオリゴペプチド構造に起因すること、しかもこのオリゴペプチド構造を有する特定のポリペプチドは、いずれも所望の育毛効果を示すだけでなく、皮膜移植、皮膚潰瘍や老化皮膚復元の際の細胞再生を促進する効果を示すことを見出した。さらに、特定のアミノ酸単位を有する水溶性オリゴペプチドが優れた上皮系細胞増殖促進作用を示すことを見出し、この知見に基づいて本発明をなすに至った。
- [0011] すなわち、本発明は、イソロイシルグリシルセリル単位を含むアミノ酸単位3〜7個、プロリルイソロイシルグリシル単位とセリル単位を含むアミノ酸単位4〜7個又はグリシルプロリルイソロイシルグリシル単位とセリル単位又はトレオニル単位を含むアミノ酸単位5〜7個を有する水溶性オリゴペプチド及びそれらの水溶性塩を提供するものである。また、本発明は、プロリルイソロイシルグリシル単位又はイソロイシルグリシルセリル単位を含むアミノ酸単位3〜7個を有する水溶性オリゴペプチド及びそれらの水溶性塩の中から選ばれた少なくとも1種を有効成分とする上皮系細胞増殖促進剤を提供するものである。
- [0012] 本発明の上皮系細胞増殖促進剤における水溶性オリゴペプチドの作用は、これらのオリゴペプチドそのものだけでなく、これらのオリゴペプチド単位をその分子構成単位として有するポリペプチドにおいても発揮されるが、分子量が500以上になると水に難溶になるので育毛剤としては好ましくない。
- [0013] このような水溶性オリゴペプチドの中で、トリペプチドとしては、イソロイシルグリシルセリン、プロリルイソロイシルグリシンがある。またテトラペプチドとしては、例えばこのト

リペプチドの前後にグリシル、アラニル、アルギニル、アスパラギル、リジル、セリル、バシル又はグルタミル基などのアミノ酸残基が結合したものを挙げることができるが、好ましいのはグリシルプロリルイソロイシルグリシン(配列表配列番号1)及びプロリルイソロイシルグリシルセリン(配列表配列番号2)である。

剤、殺菌剤、界面活性剤、噴射剤など、通常の外用液剤に慣用されている添加剤を加えることができる。これら添加剤の量としては、0.001～5質量%、好ましくは0.01～2.0質量%の範囲が好ましい。

[0032] 本発明の上皮系細胞増殖促進剤は、頭部又は患部に、1日1～5回程度塗布を繰り返して使用される。

本発明の上皮系細胞増殖促進剤は、毛包上皮細胞の増殖を用量依存的に促進させることからみて、この中の有効成分であるオリゴペプチドが上皮系細胞増殖促進効果を有することを確認することができた。

また、本発明のオリゴペプチドは上皮細胞に対して、選択的に増殖作用を示すので、他の細胞、例えばガン細胞を増殖するおそれがなく有利である。

図面の簡単な説明

[0033] [図1]は、髪の毛の発毛と脱毛のサイクルを示す説明図である。

[図2]は、実施例1で得られたトリペプチドのマスペクトルである。

[図3]は、参考例1で得られたトリペプチドのマスペクトルである。

[図4]は、実施例2で得られたテトラペプチドのマスペクトルである。

[図5]は、参考例2で得られたテトラペプチドのマスペクトルである。

[図6]は、実施例3で得られたペンタペプチドのマスペクトルである。

[図7]は、実施例5で得られたIGSについての毛包上皮細胞の増殖率を示す棒グラフである。

[図8]は、実施例5で得られたPIGについての毛包上皮細胞の増殖率を示す棒グラフである。

[図9]は、実施例5で得られたPIGSについての毛包上皮細胞の増殖率を示す棒グラフである。

[図10]は、実施例5で得られたGPIGについての毛包上皮細胞の増殖率を示す棒グラフである。

[図11]は、実施例6で得られた上皮系細胞増殖促進剤を塗布したグループ(B)及び対照グループ(A)の14日目の剃毛部位をデジタルカメラで撮影した写真図の画像をコンピューターに入力し、画像解析ソフトを用いて再生毛面積比を百分率で算出し

た図である。

[図12]は、実施例7で得られた毛包上皮細胞の細胞増殖率を示す棒グラフである。

[図13]は、実施例7で得られた表皮細胞の細胞増殖率を示す棒グラフである。

[図14]は、実施例7で得られた真皮繊維芽細胞の細胞増殖率を示す棒グラフである。

。

[図15]は、実施例7で得られた毛乳頭細胞の細胞増殖率を示す棒グラフである。

発明を実施するための最良の形態

[0034] 次に実施例によって本発明を実施するための最良の形態を説明するが、本発明はこれらによって何ら限定されるものではない。

[0035] 実施例1

自動固相合成装置(マルチシンテック社製、製品名「Syro2000」)を用い、かつ溶媒としてテトラヒドロフランを、縮合剤としてジシクロヘキシルカルボジイミドをそれぞれ用い、トリエチルアミンの存在下、ヒドロキシル基をtert-ブチル基で保護したセリンのベンジルエステルと、 α -アミノ基を9-フルオレニルメトキシカルボニル基(以下Fmoc基と略す)で保護したグリシンと、 α -アミノ基をFmoc基で保護したイソロイシンとを順次反応させて、N-Fmoc-イソロイシルグリシルセリンのベンジルエステルを製造した。

[0036] 反応終了後、生成中間体をメチルアルコールとジオキサンとの混合溶媒(体積比3:1)の中でフッ化水素酸で処理しクロマトグラフィーで精製することにより保護基の脱離とエステルの加水分解を行ったのち、ラセミ型イソロイシルグリシルセリンを得た。この場合の収率は約46%であった。

[0037] 次に、このトリペプチドをC₁₈ カラム[ヒューレットパッカード社製、製品名「HP1100」(3.0×250mm)](以下実施例2～4の純度解析に本カラムを用いた。)に通し、吸着した成分を0.1%トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリルの濃度0～30%の範囲の溶液により、流速0.4ml/分、20分間で溶出させた。その結果、トリペプチドは保持時間11.671分で溶出され、純度は95.87%であった。

[0038] また、このトリペプチドの質量を、MALDI-MS質量計[テルモバイオアナリシス社製、製品名「Dynamo」](以下実施例2～4の質量分析に本質量計を用いた。)で分

析した結果、質量(m/z , MH^+)は m/z 275. 339であることが分った。この質量分析の結果を図2に示す。

[0039] 参考例1

グリシンのベンジルエステルと α -アミノ基をFmoc基で保護したイソロイシンと、 α -アミノ基をFmoc基で保護したプロリンとを用い、実施例1と全く同様に操作してラセミ型プロリルイソロイシルグリシンを製造した。この場合の収率は約40%であった。

[0040] 次に、このトリペプチドを C_{18} カラムに通し、吸着した成分を0. 1%トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリルの濃度0~30%の範囲の溶液により、流速0. 4ml/分、20分間で溶出させた。その結果、トリペプチドは保持時間14. 052分で溶出され、純度は95. 93%であった。

[0041] また、このトリペプチドの質量を分析した結果、質量(m/z , MH^+)は m/z 285. 102であった。この質量分析の結果を図3に示す。

[0042] 実施例2

ヒドロキシル基をtert-ブチル基で保護したセリンのベンジルエステルと、 α -アミノ基をFmoc基で保護したグリシンと、 α -アミノ基をFmoc基で保護したイソロイシンと、 α -アミノ基をFmoc基で保護したプロリンとを用い、実施例1と全く同様に操作して、ラセミ型プロリルイソロイシルグリシルセリン(配列表配列番号2)を得た。この場合の収率は約54%であった。

[0043] 次に、このテトラペプチドを C_{18} カラムに通し、吸着した成分を0. 1%トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリルの濃度0~40%の範囲の溶液により、流速0. 4ml/分、20分間で溶出させた。その結果、テトラペプチドは保持時間12. 313分で溶出され、純度は95. 11%であった。

[0044] また、このテトラペプチドの質量を分析した結果、質量(m/z , MH^+)は m/z 373. 963であることが分った。この質量分析の結果を図4に示す。

[0045] 参考例2

グリシンのベンジルエステルと、 α -アミノ基をFmoc基で保護したイソロイシンと、 α -アミノ基をFmoc基で保護したプロリンと、 α -アミノ基をFmoc基で保護したグリシンとを用い、実施例1と全く同様に操作して、ラセミ型グリシルプロリルイソロイシルグリシ

ン(配列表配列番号1)を製造した。この場合の収率は約48%であった。

[0046] 次に、このテトラペプチドをC₁₈カラムに通し、吸着した成分を0.1%トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリルの濃度5~40%の範囲の溶液により、流速0.4ml/分、20分間で溶出させた。その結果、テトラペプチドは保持時間11.648分で溶出され、純度は99.60%であった。

[0047] また、このテトラペプチドの質量を分析した結果、質量(m/z , MH^+)は m/z 343.986であった。この質量分析の結果を図5に示す。

[0048] 実施例3

自動固相合成装置(マルチシンテック社製、製品名「Syro2000」)を用い、かつ溶媒としてテトラヒドロフランを、縮合剤としてジシクロヘキシルカルボジイミドをそれぞれ用い、トリエチルアミンの存在下、ヒドロキシル基をtert-ブチル基で保護したセリンのベンジルエステルと、 α -アミノ基をFmoc基で保護したグリシンと、 α -アミノ基をFmoc基で保護したイソロイシンと、 α -アミノ基をFmoc基で保護したプロリンと、 α -アミノ基をFmoc基で保護したグリシンとを順次反応させて、N-Fmoc-グリシルプロリル-イソロイシルグリシルセリン(配列表配列番号3)のベンジルエステルを製造した。

[0049] 反応終了後、生成中間体をメチルアルコールとジオキサンとの混合溶媒(体積比3:1)の中でフッ化水素酸で処理しクロマトグラフィーで精製することにより保護基の脱離とエステルの加水分解を行ったのち、ラセミ型グリシルプロリルイソロイシルグリシルセリンを得た。この場合の収率は約40%であった。

[0050] 次に、このペンタペプチドをC₁₈カラム[スぺルコ社製、製品名「Discovery C₁₈」(4.6×250mm)]に通し、吸着した成分を0.1%トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリルの濃度2~22%の範囲の溶液により、流速1.5ml/分、20分間で溶出させた。その結果、ペンタペプチドは保持時間9.761分で溶出され、純度は96.9%であった。

[0051] また、このペンタペプチドの質量を、エレクトロスプレー法を用いた正イオン測定によるLC-MS質量計[LC部:アジレント社製、製品名「Agilent1100シリーズ」、MS部:サーモエレクトロン社製、製品名「ThermoFinnigan LCQadvantage(ソフトウェアXcalibur)]]で分析した結果、質量(m/z , MH^+)は m/z 430.1であることが分った。この質量分析の結果を図6に示す。

[0052] 実施例4

ヒドロキシシル基をtert-ブチル基で保護したセリンのベンジルエステルの代りに、ヒドロキシシル基をtert-ブチル基で保護したトレオニンのベンジルエステルを用いること以外は、実施例1と全く同様に操作して、ラセミ型グリシルプロリルイソイシルグリシルトレオニン(配列表配列番号4)を製造した。このものの質量(m/z , MH^+)は m/z 444.3であった。

[0053] 実施例5

実施例1、2及び参考例1、2の上皮系細胞増殖促進剤について、マウスの毛包上皮細胞についての細胞増殖試験を行った。なお、培養培地、試験培地としては、以下のものを用いた。

[0054] (a) 培養培地

DMEM(シグマ社製、製品記号「D-5523」)

FBS(カンセラ・インターナショナル・インコーポレーテッド社製、製品記号「10100756」)

10%

ペニシリン/ストレプトマイシン(ギブコ社製、製品記号「15140-122」)

1%

(b) 試験培地

MCDB153(シグマ社製、製品記号「M7403」)

インシュリン(シグマ社製、ウシ由来、製品記号「16634」)

5 μ g/ml

アポトランスフェリン(シグマ社製、ヒト由来、製品記号「T1147」)

10 μ g/ml

EGF(アップステート・バイオテクノロジー社製、マウス由来、製品記号「01-101」)

5ng/ml

BPE(ギブコ社製、ウシ下垂体抽出物、製品記号「13028-014」)

35 μ g/ml

水溶性ハイドロコチゾン(ナカライ社製、製品記号「174-00」)

0.5 μ g/ml

エタノールアミン(和光社製、製品記号「012-12455」)

100 μ M

o-ホスホリルエタノールアミン(シグマ社製、製品記号「P0503」)

100 μ M

[0055] (1) 毛包上皮細胞の分離及び培養

新生仔マウス(生後5日齢)の皮膚から手術メスを用いて約2mm幅の短冊状に皮膚片を切り出し、5%濃度でFBS(カンセラ・インターナショナル・インコーポレーテッド社製、製品記号「10100756」)を含むDMEM(シグマ社製、製品記号「D-5523」)中に500U/mlの割合で、ディスパーゼ(合同酒精社製、ロット番号0101)を溶解した溶液中に浸漬し、4℃において16時間静置した。次いでピンセットを用いて皮膚片から表皮を剥離除去し、真皮組織のみを採取し、このようにして得られた真皮組織をPBS(-)(シグマ社製、製品記号「P-4417」)に浸し、眼科バサミを用いて細切した。このようにして得られたストリップ片を、5%濃度でFBSを含むDMEM中に、0.2%濃度でコラゲナーゼ(新田社製、ロット番号001014W)を溶解した溶液中に浸し、37℃において1時間消化したのち、1000rpmで5分間遠心分離して上清を除去し、残分にPBS(-)を加えてゆるやかにピペッティングすることにより真皮懸濁液を調製した。

[0056] 次いで、この真皮懸濁液中から真皮繊維芽細胞と毛球を分離するため、15分間静置させて毛球のみを沈殿させた。この「静置→沈殿」の操作を3回行って得られた毛球を、2.65mM EDTA水溶液中に0.25%濃度のトリプシンを溶かした液に浸し、37℃において5分間処理することにより毛包上皮細胞の分散溶液を調製した。

次に、この分散液を1000rpmで5分間遠心分離し、遠心分離後上清を除去した。得られた毛包上皮細胞を培養培地に分散させ、コラーゲンコートした96穴マイクロプレートに播種し、5%CO₂を含む雰囲気中、37℃で培養した。

[0057] (2) 細胞増殖試験

(i) 試料の調製

実施例1、2及び参考例1、2で得られたイソロイシルグリシルセリン(以下IGSと略記する)、プロリルイソロイシルグリシン(以下PIGと略記する)、プロリルイソロイシルグリ

シルセリン(配列表配列番号2)(以下PIGSと略記する)及びグリシルプロリレイソロイシルグリシン(配列表配列番号1)(以下GPIGと略記する)をそれぞれ試験培地に溶解し、いずれも0.3 μ M、1 μ M、3 μ M、10 μ M、30 μ M及び100 μ Mの6種類の濃度の試料を調製した。また、対照として試験培地のみを用いた。

[0058] (ii) 毛包上皮細胞増殖試験

細胞を播種してから24時間後、培養液を除去し、培養細胞をMCDB153溶液で洗浄した。この培養細胞に前記の試料を100 μ lずつ各穴に加え、5%CO₂含有雰囲気中、37℃において培養した。

[0059] 4日後、アラマー・ブルー試薬(登録商標名、バイオソース社製、カタログ番号DAL 1100、ロット番号AB083002)を各穴ごとに10 μ lずつ添加し、再び5%CO₂雰囲気中、37℃において培養を継続した。2時間培養したのち、マイクロプレートリーダー(ラボシステムズ社製、製品名「フルオロスキャンアセントFL」)で蛍光強度(励起波長; 544nm、測定波長; 590nm)を測定し、細胞数を評価した。

[0060] なお、評価は、実施例1、2及び参考例1、2で得られたペプチドの細胞増殖度を、対照の細胞増殖度に対する比率(百分率)で算出し、細胞増殖比の平均値±標準偏差(n=5)で表わして行った。有意差の検定は、ダネットの多重比較検定(アバカスコンセプト社製、ソフトウェア「スーパーアノヴァ V. 1. 11」)により行い、危険率5%未満(p<0. 05)の場合、有意差ありとした。このようにして得られたIGSの結果を図7に、PIGの結果を図8に、PIGSの結果を図9に、GPIGの結果を図10に、それぞれ棒グラフとして示す。

[0061] (iii) 結果

図7より、IGSについては、0.3、1、3、10、30及び100 μ Mの細胞増殖率は、対照群と比較してそれぞれ98、103、106、124、134及び133%であり、10 μ M以上の濃度で有意差(すべてp<0. 01)が認められた。

[0062] 図8より、PIGについては、0.3、1、3、10、30及び100 μ Mの細胞増殖率は、対照群と比較してそれぞれ101、103、113、132、131及び134%であり、1 μ M以上の濃度で有意差(3 μ M:p<0. 05; 10、30及び100 μ M:p<0. 01)が認められた。

。

- [0063] 図9より、PIGSについては、0. 3、1、3、10、30及び100 μ Mの細胞増殖率は、対照群と比較してそれぞれ104、103、108、110、127及び133%であり、3 μ M以上の濃度で有意差(3及び10 μ M: $p < 0. 05$; 30及び100 μ M: $p < 0. 01$)が認められた。
- [0064] 図10より、GPIGについては、0. 3、1、3、10、30及び100 μ Mの細胞増殖率は、対照群と比較してそれぞれ105、108、118、133、134及び138%であり、0. 3 μ M以上の濃度で有意差(0. 3 μ M: $p < 0. 05$; 1、3、10、30及び100 μ M: $p < 0. 01$)が認められた。
- [0065] しかも、表皮細胞、真皮繊維芽細胞及び毛乳頭細胞に対する試験を行ったところ、本発明の上皮系細胞増殖促進剤は、表皮細胞に対しては毛包上皮細胞と同様に細胞増殖作用を示したものの、真皮繊維芽細胞及び毛乳頭細胞に対しては何らの影響も与えないことが分った。
- [0066] 実施例6
- 実施例3で得られたペンタペプチド1mgを注射用水(大塚製薬社製、製品記号「057-00456」) 300 μ lに溶解し、プロピレングリコール(和光社製、製品記号「161-05006」) 200 μ l及びエチルアルコール(和光社製、製品記号「057-00456」) 500 μ lを加えて混合し、濃度1mg/mlの上皮系細胞増殖促進剤を製剤した。
- 別に7週齢のC3H/He系雌マウス10匹を1週間飼育し、馴化させたのち、毛周期が休止期にあるマウスの背部毛を電気バリカン及び電気シェーバーを用いて剃毛して実験用動物とした。
- [0067] 次に、この実験用動物を5匹ずつの2グループに分け、剃毛後3日目から第1グループには1日1回剃毛部位に100 μ l/匹の上皮系細胞増殖促進剤を塗布し、第2グループには、対照用として注射用水とプロピレングリコールとエチルアルコールの混合物(体積比3:2:5)のみを塗布した。塗布後14日目に剃毛部位をデジタルカメラで撮影したところ、本発明の上皮系細胞増殖促進剤を塗布したグループ(B)は、対照グループ(A)に比べ明らかに発毛促進が認められた。
- [0068] 次に、この画像をコンピューターに入力し、画像解析ソフトを用いて再生毛面積比(再生毛部位のピクセル数/剃毛部位のピクセル数)を百分率で算出した。有意差の

検定は、スチューデントのt検定(アバカスコンセプツ社製ソフトウェア「stattview J-4. 02」)により行い、危険率5%未満($p < 0. 05$)の場合、有意差ありとした。

- [0069] その結果を図11に示した。この図において、白い部分が毛が生えていない部分であり、黒い部分が毛が生えている部分である。この結果によると、対照グループ(A)の再生毛面積比は、 $36. 9\% \pm 5. 7\%$ であるのに対し、本発明の上皮系細胞増殖促進剤を塗布したグループ(B)の再生毛面積比は $66. 6 \pm 3. 5\%$ であり、有意($p < 0. 01$)に毛の再生が促進されることが分った。

[0070] 実施例7

実施例3で得られたオリゴペプチドの上皮系細胞増殖促進剤としての細胞選択性を確認するために、以下のようにして皮膚組織に存在する細胞すなわち毛包上皮細胞、表皮細胞、真皮繊維芽細胞及び毛乳頭細胞に対する細胞増殖作用の有無を調べた。なお、培養培地、試験培地としては、実施例5と同じものを用いた。

[0071] (1) 毛包上皮細胞、表皮細胞、真皮繊維芽細胞及び毛乳頭細胞の調製

生後5日齢のC3H/HeN系新生仔マウスの皮膚を無菌的に採取し、手術用メスを用いて皮膚片を約2mm幅の短冊状のサンプルとした。5質量%のFBS(カンセラ・インターナショナル・インコーポレーテッド社製、ロット番号0101)を含むDMEM(シグマ社製、製品記号「D-5523」)中に500U/mlのディスパーゼ(合同酒精社製、ロット番号0101)を溶かした溶液を調製し、この中に上記サンプルを浸し、4℃において16時間静置したのち、ピンセットを用いて皮膚片から表皮組織を剥離し、真皮組織と分離した。得られた表皮組織は表皮細胞の分離に、また真皮組織は毛包上皮細胞及び真皮繊維芽細胞の分離に供した。

- [0072] このようにして得られた真皮組織を(PBS)(-) (シグマ社製、製品記号「P-4417」)に浸し、眼科バサミを用いて細切りし、5質量%のFBSを含むDMEM中に0. 2質量%のコラゲナーゼ(新田社製、ロット番号001014W)を溶かした液に浸し、37℃において1時間消化した。このようにして得られた真皮消化液を1000rpmで5分間遠心分離し、上清を除去したのち(PBS)(-)を加えて緩やかにピペティングし、真皮懸濁液を調製した。

- [0073] 次いで、この真皮懸濁液中から真皮繊維芽細胞と毛球を分離するため、15分間静

置させて毛球のみを沈殿させた。この「静置→沈殿」の操作を3回行った。得られた毛球を、2.65mM EDTA水溶液中に0.25質量%のトリプシンを溶かした液に浸し、37℃において5分間処理することにより毛包上皮細胞分散液を調製した。

[0074] 次に、この分散液を1000rpmで5分間遠心分離し、遠心分離後上清を除去した。得られた毛包上皮細胞を培養培地に分散させ、コラーゲンコートした96穴マイクロプレートに播種し、5%CO₂を含む雰囲気中、37℃で培養した。

[0075] 他方、一回目の「静置→沈殿」の操作で上清に浮遊している真皮繊維芽細胞を回収し、1000rpmで5分間遠心分離し、遠心分離後上清を除去した。得られた真皮繊維芽細胞を培養培地に分散させ、96穴マイクロプレートに播種し、5%CO₂を含む雰囲気中、37℃で培養した。

[0076] 上記の表皮組織を、2.65mM EDTA水溶液中に0.25質量%のトリプシンを溶かした溶液に浸し、37℃において5分間処理することにより、表皮細胞分散液を調製した。

次いで、この分散液を1000rpmで5分間遠心分離し、上清を除去した。得られた表皮細胞を培養培地に分散させ、コラーゲンコートした96穴マイクロプレートに播種し、5%CO₂を含む雰囲気中、37℃において培養した。

また、ヒト毛乳頭細胞(トーヨーボー社製、製品記号「602-05」)を培養培地に分散させ、コラーゲンコートした96穴マイクロプレートに播種し、5%CO₂を含む雰囲気中、37℃において培養した。

[0077] (2)細胞増殖試験

(i)試料の調製

実施例3で得られたペントペプチド1mgを、試験培地232.8μlに加え、かきまぜて溶解することにより、10mM溶液を調製した。次いで、この10mM溶液を段階的に希釈し、100μM(No. 1)、30μM(No. 2)、10μM(No. 3)、3μM(No. 4)、1μM(No. 5)及び0.3μM(No. 6)濃度の6種類の試料を調製し、また対照としては試験培地のみを用いた。

[0078] (ii)毛包上皮細胞及び表皮細胞増殖試験

細胞を播種してから24時間後、培養液を除去し、培養細胞をMCDB153溶液で

洗浄した。この培養細胞に前記の試料を100 μ l/well加え、5%CO₂含有雰囲気中、37℃において培養した。4日後、アラマブルー試薬(登録商標名、バイオソース社製、カタログ番号DAL1100、ロット番号AB083002)を各wellに10 μ lずつ添加し、再び5%CO₂含有雰囲気中、37℃において培養した。2時間後、マイクロプレートリーダー(ラボシステムズ社製、製品名「フルオロスキャンアセントFL」)で蛍光強度(励起波長;544nm、測定波長;590nm)を測定し、細胞数を評価した。有意差の検定は、ダネットの多重比較検定(アバカスコンセプト社製、ソフトウェア「スーパーアノヴァ V. 1. 11」)により行い、危険率5%未満($p < 0. 05$)の場合、有意差ありとした。

このようにして得られた毛包上皮細胞増殖試験結果を図12に、また表皮細胞増殖試験の結果を図13にそれぞれ棒グラフとして示す。

[0079] (iii) 真皮繊維芽細胞及び毛乳頭細胞増殖試験

細胞を播種してから24時間後、培養液を除去し、培養細胞をDMEM溶液で洗浄した。この培養細胞に前記の試料を100 μ l/wellを加え、5%CO₂含有雰囲気中、37℃において培養した。またこの際、陽性対照として培養培地を用いて同様に培養した。3日後、アラマブルー試薬(バイオソース社製、製品記号「341-077612」)を各wellに10 μ lずつ添加し、再び5%CO₂含有雰囲気中、37℃において培養した。2時間後、マイクロプレートリーダー(ラボシステムズ社製、製品名「フルオロスキャンアセントFL」)で蛍光強度(励起波長;544nm、測定波長;590nm)を測定し、細胞数を評価した。

このようにして得られた真皮繊維芽細胞試験の結果を図14に、毛乳頭細胞試験の結果を図15にそれぞれ棒グラフとして示す。

[0080] (iv) 結果

図12より、毛包上皮細胞では、各試料の細胞増殖率は対照と比較して、それぞれ101%(No. 6)、111%(No. 5)、124%(No. 4)、141%(No. 3)、142%(No. 2)及び141%(No. 1)であり、1 μ M濃度以上で有意差($p < 0. 01$)が認められた。

このことから、実施例3の上皮細胞増殖促進剤は1 μ Mから用量依存的な毛包上皮細胞増殖促進作用を示すことが分った。

[0081] 図13より、表皮細胞では、各試料の細胞増殖率は対照と比較して、それぞれ102% (No. 6)、110% (No. 5)、118% (No. 4)、124% (No. 3)、127% (No. 2)及び127% (No. 1)であり、 $1\mu\text{M}$ 濃度以上で有意差($1\mu\text{M}$ の場合 $p<0.05$ 、 $3\mu\text{M}$ 以上の濃度の場合 $p<0.01$)が認められた。

このことから、実施例3の上皮細胞増殖促進剤は毛包上皮細胞に加えて表皮細胞に対してもまた $1\mu\text{M}$ から用量依存的な増殖促進作用を示すことが分った。

[0082] 一方、図14及び図15から、真皮繊維芽細胞及び毛乳頭細胞に対しては何らの影響も与えないことが分かる。

これらの事実より、実施例3の上皮系細胞増殖促進剤は、上皮系細胞に分類される毛包上皮細胞及び表皮細胞に対して選択的に細胞増殖作用を示すことが分った。

[0083] このように、本発明の上皮系細胞増殖促進剤は、上皮系細胞に分類される毛包上皮細胞及び表皮細胞に対して選択的に細胞増殖作用を示すので、塗布剤例えばローション剤として用いた場合に、皮膚組織を構成する上皮系細胞以外の細胞に悪影響を及ぼさない。

産業上の利用可能性

[0084] 本発明の化合物は、上皮系細胞増殖促進剤として、育毛用、皮膚再生用に利用することができる。また、本発明によると、育毛効果のみでなく、皮膚再生効果、アトピー性皮膚炎治療効果を奏する優れた新規な上皮系細胞増殖促進剤が提供される。

請求の範囲

[1] (削除)

[2] (削除)

[3] (削除)

[4] (削除)

[5] (削除)

[6] (削除)

[7] (削除)

[8] (削除)

[9] (削除)

[10] (削除)

[11] (削除)

[12] (削除)

[13] (追加)

プロリルイソロイシルグリシル単位又はイソロイシルグリシルセリル単位を含むアミノ酸単位3個から7個までの水溶性オリゴペプチド及びそれらの水溶性塩の中から選ばれた少なくとも1種を有効成分とする上皮系細胞増殖促進剤。

[14] (追加)

水溶性オリゴペプチドがプロリルイソロイシルグリシンである請求の範囲第13項記載の上皮系細胞増殖促進剤。

[15] (追加)

水溶性オリゴペプチドがイソロイシルグリシルセリンである請求の範囲第13項記載の上皮系細胞増殖促進剤。

[16] (追加)

水溶性オリゴペプチドがプロリルイソロイシルグリシル単位とグリシル単位又はセリル単位からなる請求の範囲第13項記載の上皮系細胞増殖促進剤。

[17] (追加)

水溶性オリゴペプチドがグリシルプロリルイソロイシルグリシンである請求の範囲第1

6項記載の上皮系細胞増殖促進剤。

[18] (追加)

水溶性オリゴペプチドがプロリルイソロイシルグリシルセリンである請求の範囲第16項記載の上皮系細胞増殖促進剤。

[19] (追加)

水溶性オリゴペプチドがグリシルプロリルイソロイシルグリシル単位とセリル単位又はトレオニル単位からなるオリゴペプチドである請求の範囲第13項記載の上皮系細胞増殖促進剤。

[20] (追加)

水溶性オリゴペプチドがグリシルプロリルイソロイシルグリシルセリンである請求の範囲第19項記載の上皮系細胞増殖促進剤。

[21] (追加)

水溶性オリゴペプチドがグリシルプロリルイソロイシルグリシルトレオニンである請求の範囲第19項記載の上皮系細胞増殖促進剤。

[22] (追加)

育毛のための請求の範囲第13～21項のいずれかに記載の上皮系細胞増殖促進剤。

[23] (追加)

毛髪休止期に作用する育毛のための請求の範囲第22項記載の上皮系細胞増殖促進剤。

[24] (追加)

イソロイシルグリシルセリル単位を含むアミノ酸単位3個から7個までの水溶性オリゴペプチド及びそれらの水溶性塩。

[25] (追加)

イソロイシルグリシルセリンである請求の範囲第24項記載の水溶性オリゴペプチド及びその水溶性塩。

[26] (追加)

プロリルイソロイシルグリシル単位とセリル単位を含むアミノ酸単位4個から7個までの

水溶性オリゴペプチド及びその水溶性塩。

[27] (追加)

プロリルイソロイシルグリシルセリンである請求の範囲第26項記載の水溶性オリゴペプチド及びその水溶性塩。

[28] (追加)

グリシルプロリルイソロイシルグリシル単位とセリル単位又はトレオニル単位を含むアミノ酸単位5個から7個までの水溶性オリゴペプチド及びその水溶性塩。

[29] (追加)

グリシルプロリルイソロイシルグリシルセリンである請求の範囲第28項記載の水溶性オリゴペプチド及びその水溶性塩。

[30] (追加)

グリシルプロリルイソロイシルグリシルトレオニンである請求の範囲第28項記載の水溶性オリゴペプチド及びその水溶性塩。